

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin
(Leiter: Professor Dr. med. Max Schwab)

Die Bestimmung thyreotroper Antikörper
im Radioliganden-Rezeptor-Versuch
- Untersuchung zur Pathogenese
des Morbus Basedow -

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

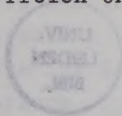
vorgelegt
von
Dürthen Geißler
aus
Bad Homburg v.d.H.

1977

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin
(Leiter: Professor Dr. med. Max Schwab)

Die Bestimmung thyreotroper Antikörper
im Radioliganden-Rezeptor-Versuch
- Untersuchung zur Pathogenese
des Morbus Basedow -

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt
von
Dürthen Geißler
aus
Bad Homburg v.d.H.

Referent: Prof. Dr. med. H. Schleusener

Korreferent: Prof. Dr. med. P. Freyschmidt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3. 3. 1977



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	5
2. <u>Methodik</u>	9
2.1. Radioliganden-Rezeptor-Versuch	9
2.1.1. Prinzip	9
2.1.2. Präparation der Membranen	9
2.1.3. Jodierung von TSH	10
2.1.4. Präparation des IgG	11
2.1.5. Durchführung des Radioliganden-Rezeptor-Versuches	12
2.1.6. Auswertung	13
2.2. McKenzie-Versuch	13
2.3. Sonstige Methoden zur diagnostischen Sicherung des Morbus Basedow	15
2.3.1. TRH-Stimulationstest	16
2.3.2. HTSH im Serum	17
2.3.3. Gesamtthyroxin im Serum	17
2.3.4. Trijodthyronin-Bindungsindex (Hamolsky-Test)	17
2.3.5. Berechnung des "Freies-Thyroxin-Index" aus 2.3.3. und 2.3.4.	18
2.3.6. Trijodthyronin im Serum	18
2.3.7. Schilddrüsenszintigraphie	19
3. <u>Resultate</u>	
3.1. Standardkurve für TSH im Radioliganden-Rezeptor-Versuch	20
3.2. Standardkurve für LATS im Radioliganden-Rezeptor-Versuch	20
3.3. Beispiel eines Radioliganden-Rezeptor-Versuches	20
3.4. Ergebnisse der Radioliganden-Rezeptor-Versuche	24
3.5. Ergebnisse der McKenzie-Versuche	24
3.6. Ergebnisse bei Testung nach beiden Methoden	24
3.7. Ergebnisse der sonstigen klinischen Untersuchungen	27

4. Diskussion

31

- LATS und LATS-Protector (HTSI) als schilddrüsenstimulierende Antikörper bei Morbus Basedow 31
- Häufigkeit thyreotroper Immunglobuline im Radioliganden-Rezeptor-Versuch - Unsere Ergebnisse und Vergleich mit denen anderer Autoren - 31
- Der Nachweis der Schilddrüsenstimulation durch thyreotrope Antikörper in vitro und in vivo 34
- Korrelation der Ergebnisse im Radioliganden-Rezeptor-Versuch und im McKenzie-Versuch - Die Heterogenität der thyreotropen Antikörper - 35
- Korrelation der Ergebnisse im Radioliganden-Rezeptor-Versuch und der sonstigen klinischen Untersuchungsmethoden 37
- Zellgebundene Immunität - ein weiterer Aspekt zur Pathogenese des Morbus Basedow 38

5. Zusammenfassung

40

6. Literaturverzeichnis

41

1. EINLEITUNG

Seit Adams und Purves (1) im Jahre 1956 nachwiesen, daß ein unbekannter Faktor im Serum von Basedow-Patienten die Schilddrüse des Meerschweinchens zur Sekretion von ^{131}J stimuliert, und seit Kriss et al. (33) 1964 feststellten, daß dieser Faktor, der "Long-Acting Thyroid Stimulator" (LATS) genannt wurde, ein Immunglobulin G (IgG) ist, steht zur Diskussion, ob der Morbus Basedow zu den Autoaggressionserkrankungen zählt.

Diese Hypothese wird von folgenden Faktoren indirekt unterstützt:

1. Bei dem Morbus Basedow handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine genetisch determinierte Erkrankung, die zusammen mit Hashimoto-Thyreoiditis und anderen Autoimmunerkrankheiten familiär gehäuft auftritt (Buchanan et al. (11), Fialkow (23), Wall et al. (72)).
2. Bei Patienten mit Morbus Basedow und ihren Familienangehörigen werden mit besonderer Häufigkeit organspezifische Autoantikörper nachgewiesen (Fialkow (23)).
3. Basedow-Patienten weisen regelmäßig Hyperplasien von Thymus und Lymphgewebe auf sowie lymphozytäre Infiltrationen der Schilddrüse (Buchanan et al. (11), Gunn et al. (26), Michie et al. (53)).
4. In Basedow-Strumen wurden sowohl im Stroma als auch in der Basalmembran der Schilddrüsenfollikel die Immunglobuline G, M und E nachgewiesen (Werner et al. (76)).
5. Unter Therapie von Basedow-Patienten mit Immunsuppressiva besserte sich das klinische Bild und normalisierten sich die Laborwerte (Schleusener und Schimmelpfennig (61), Werner und Platman (75)).

Weitere Unterstützung für die pathogenetische Rolle von LATS findet man durch den Nachweis von LATS im Serum von Neugeborenen mit neonataler Hyperthyreose und deren Müttern. Die LATS-Aktivität im Serum der Mütter blieb post partum konstant, wohingegen sie im Serum der Neugeborenen abfiel (Halbwertszeit

1 - 2 Wochen). Dabei kam es gleichzeitig zu einer spontanen Besserung des klinischen Bildes beim Neugeborenen (Elsas et al. (21), Maisy und Stimmler (42), Major und Munro (43), McKenzie (46), Sunshine et al. (68)).

Was nun ist LATS und wie wirkt es?

LATS ist ein humoraler Antikörper, dessen korrespondierendes Antigen in der Schilddrüsenzellmembran lokalisiert sein soll (McKenzie und Gordon (47), Miyai et al. (54), Wall et al. (73)). Es wurde im Serum von Basedow-Patienten nachgewiesen, aber auch bei deren Verwandten (Wall et al. (72)). Es stimuliert die Schilddrüse vieler Säugetiere (Field et al. (24), Pinchera et al. (59), Scott et al. (63)), jedoch nicht die Schilddrüse eines Kükens (Lepp und Oliner (39)). Die LATS-Aktivität ist nicht von der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Blut abhängig (Kriss et al. (34)), wie dies für das schilddrüsen-stimulierende Hormon ("Thyroid-Stimulating Hormone" = TSH) aus dem Hypophysenvorderlappen der Fall ist.

LATS wirkt ähnlich wie TSH. Beide binden sich an einen Rezeptor in der Membran der Schilddrüsenzellen und stimulieren die ebenfalls in der Schilddrüsenzellmembran lokalisierte Adenylzyklase und durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) die Stoffwechselprozesse in der Schilddrüse (Burke (14), Kaneko et al. (30), Kendall-Taylor (31), Levey und Pastan (40), Yamashita und Field (78)). Die Wirkung von LATS in vivo setzt jedoch etwas später ein als von TSH und hält länger an (Brown et al. (10), Burke (12, 13)).

Gegen eine alleinige Rolle dieser humoralen Antikörper bei der Pathogenese des Morbus Basedow sprechen jedoch folgende Befunde:

1. Bei nur wenigen Patienten mit Morbus Basedow wird LATS durch einen positiven McKenzie-Versuch festgestellt, eine Tatsache, die nicht allein durch eine geringe Empfindlichkeit des Tests erklärt werden kann (Carneiro (15)).
2. Bei einigen Patienten, in deren Serum LATS nachgewiesen wurde, konnte durch Gabe von Schilddrüsenhormonen eine

Suppression der intrathyreoidalen Jodaufnahme erreicht werden (Chopra et al. (17), Silverstein und Burke (65), Wong und Doe (77)).

Humorale Antikörper bei Morbus Basedow wurden bisher in einem Mäuseversuch nach McKenzie (45, 48) nachgewiesen. In der Zwischenzeit sind mit anderen Methoden bei weitaus mehr Patienten thyreotrope Antikörper gefunden worden, als mit dem McKenzie-Versuch nachweisbar waren. 1971 entdeckten Adams und Kennedy (2) in der IgG-Fraktion von Basedow-Patienten einen Faktor, der verhinderte, daß LATS durch Zugabe von menschlichem Schilddrüsenextrakt neutralisiert wurde. Bei Zugabe von Mäuseschilddrüsenhomogenat wurde LATS neutralisiert. Diese thyreotrope Substanz wurde auf Grund der Versuchsanordnung "LATS-Protector" genannt. LATS-Protector stimuliert nur die menschliche Schilddrüse (Adams et al.(4)). Später wurde vorgeschlagen, diese Substanz wieder "Human Thyroid Stimulating Immunoglobulin" (HTSI) zu nennen (38).

Onaya et al. (57) wiesen mit einem In-vitro-Test die Anwesenheit eines anderen "Human Thyroid Stimulators" (HTS) in 82 % der LATS-negativen Seren von unbehandelten hyperthyreoten Patienten nach, indem sie die intrazellulär gebildeten Kolloidtröpfchen in 25 Follikeln von menschlichen Schilddrüsen Schnitten nach Inkubation mit den Seren zählten.

Orgiazzi et al. (58) fanden bei einigen Patienten mit Morbus Basedow einen "Human Thyroid Adenylcyclase Stimulator" (HTACS), der bei Inkubation von Patienten-IgG mit menschlichen Schilddrüsenmembranen die Adenylzyklase-Aktivität merklich erhöhte, was durch Messung der cAMP-Konzentration bewiesen wurde, und wobei HTACS nicht signifikant mit LATS korrelierte.

Ein anderes, neu entwickeltes Nachweissystem, der Radioliganden-Rezeptor-Versuch, beruht auf der Inhibierung der Bindung von ^{125}J -TSH an die menschliche Schilddrüsenmembran durch "Thyroid-Stimulating Immunoglobulins" und wird beschrieben von Mehdi et al. (50, 51) sowie Smith und Hall (67).

Aus den oben dargelegten Ausführungen ergeben sich nun als Fragen:

1. Wie häufig treten bei Basedow-Patienten thyreotrope Immun-

globuline auf?

2. Wie korrelieren die Ergebnisse von Untersuchungen im Radioliganden-Rezeptor-Versuch mit denen im McKenzie-Versuch, und
3. wie korrelieren die Ergebnisse des Radioliganden-Rezeptor-Versuches mit denen der sonstigen diagnostischen Schilddrüsen-Funktionstests?

2. M E T H O D I K

2.1. Radioliganden-Rezeptor-Versuch

2.1.1. Prinzip

Dieser Versuch wurde nach einer Methode von Mehdi und Nussey (51) durchgeführt, gering modifiziert wie unten beschrieben.

Der Radioliganden-Rezeptor-Versuch weist das Vorhandensein von thyreotropen Antikörpern in der IgG-Fraktion von Patienten mit Morbus Basedow nach:

Schilddrüsenmembranen werden mit den antikörperverdächtigen Seren bzw. Immunglobulin-Fraktionen inkubiert, wobei die spezifischen Immunglobuline die Bindung von ^{125}J -TSH an die Rezeptoren in der Schilddrüsenzellmembran dosisabhängig inhibieren.

2.1.2. Präparation der Membranen

Zur Gewinnung von Schilddrüsenzellmembranen wurde eine modifizierte Methode nach Mehdi und Nussey (51) benutzt.

Zur Verwendung gelangt das operativ entfernte Schilddrüsen-gewebe von Patienten mit euthyreoten und hyperthyreoten Strumen, das spätestens 15 Minuten nach Entnahme bei $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wird. In gefrorenem Zustand sind die Schilddrüsenpräparate monatelang haltbar.

Alle Arbeiten werden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Ca. 20 g Schilddrüsen-gewebe werden in noch gefrorenem Zustand mit einem Skalpell und einer Schere zerkleinert und mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,14 M NaCl, 0,01 M MgCl_2 und 0,001 M NaHCO_3 , pH 7,5, aufgeschwemmt, und zwar 3 ml Puffer pro 1 g Gewebe.

Das Schilddrüsen-gewebe wird mit einem Silverson Mixer-Emulsifier homogenisiert (6mal je 5 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit mit jeweils 30 Sekunden Unterbrechung zum Abkühlen). Dabei steht das Gefäß im Eiswasser.

Anschließend wird in einem Potter-Elvehjem-Glasgefäß mit einem lose sitzenden Teflonstempel dreimal homogenisiert und ein eventueller Überschuß an Bindegewebe durch 2 Schich-

ten Gaze-Filter entfernt.

Danach zentrifugiert man das Filtrat in einer automatischen Höchstgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge Sorvall RC-2-B (Fa. Horth-Vetter, Wiesloch/Baden) bei 2.500 UpM und 4 °C für 10 Minuten im Festwinkelrotor SS-34 ($\approx 700 \times g$).

Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette entnommen und das Sediment mit dem gleichen Puffer aufgeschwemmt und erneut zentrifugiert wie oben beschrieben. Das Sediment wird verworfen. Beide Überstände werden dann vereinigt und 20 Minuten lang bei 14.200 UpM im Festwinkelrotor SS-34 zentrifugiert ($\approx 25.000 \times g$).

Der Überstand wird verworfen, das Sediment im gleichen Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert bei 25.000 $\times g$ für 20 Minuten. Der Überstand wird verworfen.

Die 700 - 25.000 $\times g$ - Sedimente werden in dem gleichen Puffer suspendiert und über 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,14 M NaCl, 0,001 M NaHCO₃, 0,01 M MgCl₂ und 1,31 M Saccharose, pH 7,5, geschichtet. Zentrifugiert wird in der Präparativen Ultrazentrifuge L-2 (Fa. Beckman Instruments GmbH, München) bei 25.000 UpM und 4 °C für 4 Stunden mit Schwingbecherrotor SW 25.2.

Danach bilden die Membranen eine weißliche Suspension auf der Trennlinie zwischen der 1,31 M Saccharoselösung und dem Überstand. Man entnimmt die Membranfraktion mit einer Pasteurpipette und wäscht sie zweimal mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,14 M NaCl und 0,001 M NaHCO₃, pH 7,5, bei 50.000 UpM und 4 °C im Festwinkelrotor 50 Ti für 60 Minuten ($\approx 160.000 \times g$).

Die sedimentierten Membranen werden in dem zuletzt genannten Puffer resuspendiert. Der Proteingehalt der Membranaufarbeitung wird nach der Methode von Lowry et al. (41) bestimmt und die Membranlösung mit demselben Phosphatpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml gebracht.

Eingefroren bei - 28 °C sind die Membranen längere Zeit haltbar.

2.1.3. Jodierung von TSH

Die Markierung des TSH erfolgt nach der Methode von Hunter und Greenwood (29), modifiziert nach Mehdi und Nussey (51).

Hochgereinigtes Rinder-TSH (von Dr. J.G. Pierce, Los Angeles, USA) oder Schweine-TSH (von Dr. G. Hennen, Lüttich, Belgien) mit einer spezifischen biologischen Aktivität von ca. 30 U/mg wird in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, gelöst (0,5 mg/ml) und bei - 28 °C aufbewahrt.

Zu 2,5 µg TSH (= 5 µl) werden 100 µl 0,25 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, sowie 1 mCi (= 10 µl) Na¹²⁵J (Amersham IMS 31) pipettiert.

Die Reaktion wird bei Raumtemperatur in Gang gesetzt durch Zugabe von 5 µg Chloramin-T, das in 5 µl 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,1 M NaCl, pH 7,5, gelöst ist.

Nach 30 Sekunden wird die Reaktion gestoppt durch 15 µg Natriumdisulfit, gelöst in 5 µl 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,1 M NaCl, pH 7,5.

Nun fügt man 2 Tropfen "Transfer Solution" zu (10 mg Bromphenolblau, 1 g KJ, 10 g Saccharose, aufgefüllt auf 100 ml mit Aqua bidest.).

Dieses Reagens wird auf eine Sephadex G-50-fine-Säule (1 x 15 cm) gegeben und mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,1 M NaCl, pH 7,5, eluiert. Die Gel-Säule wurde vorher bei Raumtemperatur mit 10 ml 5 %iger Rinderalbuminlösung (Behring-Werke, Berlin) im Elutionspuffer gespült.

Von dieser Säule werden 0,5 ml-Fractionen in Röhrchen gesammelt, in denen sich jeweils 0,5 ml 5 %iges Rinderserumalbumin befinden.

Man entnimmt 50 µl aus jedem Röhrchen und mißt jeweils 0,1 Minuten lang die Radioaktivität in einem Packard-γ-Counter-Probenwechsler, um hieraus die spezifische Radioaktivität des mit ¹²⁵J markierten TSH zu berechnen. Sie soll zwischen 60 und 80 µCi/µg TSH liegen.

Die Proben können bei - 70 °C eingefroren werden und sind dann ca. 2 Wochen lang haltbar.

2.1.4. Präparation des IgG

Zu 4 ml Patientenserum werden unter ständigem Rühren 3 ml 3,75 M Ammoniumsulfatlösung gegeben und dann bei Raumtemperatur 20 Minuten stehengelassen. Nach Zentrifugieren bei

2.000 x g für 20 Minuten werden der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit 1,6 M Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Das Sediment wird in 0,5 ml Aqua bidest. gelöst und 24 Stunden gegen 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,05 M NaCl, pH 7,5, dialysiert. Schließlich wird bei 50.000 UpM 30 Minuten lang in einem Beckman-Festwinkelrotor 50 Ti zentrifugiert.

Zur Proteinbestimmung werden 50 µl klarer Überstand mit 3 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,05 M NaCl, pH 7,5, vermischt und die Absorption bei 280 nm in 1 cm-Quarzküvetten gegen Pufferleerwert im Digital DB-GT Spektralphotometer (Fa. Beckman Instruments GmbH, München) gemessen. Die Absorption sollte 0,46 betragen, was einer Konzentration des IgG von 20 mg/ml entspricht. Die Ansätze werden mit 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,05 M NaCl, pH 7,5, auf diesen Wert eingestellt.

Die IgG-Präparate sind bei - 70 °C aufzubewahren.

2.1.5. Durchführung des Radioliganden-Rezeptor-Versuches

400 µl Schilddrüsenmembransuspension ($\hat{=}$ 0,4 mg Protein in 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,14 M NaCl und 0,001 M NaHCO₃, pH 7,5) werden mit 100 µl der zu testenden Probe 2 Stunden lang bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach werden jeweils ca. 20.000 cpm (20 µl) ¹²⁵J-TSH zugegeben und weitere 2 Stunden inkubiert.

Nach Zentrifugation bei 50.000 UpM in einem Beckman-Festwinkelrotor 50 Ti für 40 Minuten wird der Überstand entnommen, und die Radioaktivität von Membransediment (bound = B) und Überstand (free = F) getrennt gemessen.

Getestet werden IgG-Präparationen von Basedow-Patienten oder Normalpersonen (2 mg Protein in 100 µl).

Zur Erstellung der TSH-Standardkurve wurden die angegebenen TSH-Mengen in 100 µl IgG-Präparation gelöst, die aus TSH-freiem Serum einer Normalperson gewonnen wurde.

Zur Erfassung der unspezifischen Bindung von ¹²⁵J-TSH an Membran und Röhrchen wird in Kontrollröhrchen ein Überschuß an kaltem TSH zugesetzt (400 mU Thyreostimulin, Fa. Organon, Oberschleisheim).

Alle Proben werden doppelt angesetzt.

2.1.6. Auswertung

Aus den Meßwerten von Sediment und Überstand wird für jede Probe

$$\frac{B}{F} \times 100 = \frac{\text{cpm (Sediment)}}{\text{cpm (Überstand)}} \times 100 \quad [\%]$$

berechnet.

Aus den Werten der Normalpersonen werden der Mittelwert $\left(\frac{B}{F} \times 100\right)_N$ und die doppelte Standardabweichung (2 SD) kalkuliert.

Die untere Grenze des Normalbereiches wird definiert als

$$\left(\frac{B}{F} \times 100\right)_N - 2 \text{ SD}$$

Alle IgG-Präparationen mit darunterliegenden Werten sind als positiv zu betrachten.

2.2. McKenzie-Versuch

Zum Nachweis von LATS-Aktivität in Patientenseren wurde der "bio-assay" von McKenzie (45), modifiziert 1966 (McKenzie und Williamson (48)), durchgeführt.

Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, daß TSH oder LATS, in Mäuse injiziert, die Schilddrüse der Tiere zur Schilddrüsenhormonausschüttung anregt.

25 g schwere weibliche Mäuse von der Koloniezucht CF 1 (Fa. Winkelmann, Kirchborchen) werden 10 Tage lang bei gleichbleibenden Temperatur- und Lichtverhältnissen jodarm ernährt (Standardkost der Fa. Altromin GmbH, Lage/Lippe). Jede Gruppe besteht aus 5 Tieren.

Am 11. Tag werden jeder Maus injiziert:

a) intraperitoneal: 15 µCi trägerfreies Na^{125}J in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung und

b) subcutan: 10 µg Na-L-Thyroxin (Fa. E. Merck, Darmstadt).

Das Natrium-L-Thyroxin wird in einer kleinen Menge 0,1 N NaOH in 70 %igem Alkohol gelöst und zum Gesamtvolumen (0,1 ml/Tier)

mit physiologischer NaCl aufgefüllt.

An den drei darauf folgenden Tagen werden jeweils die gleichen Mengen Na-L-Thyroxin subcutan injiziert.

Durch die Zufuhr von L-Thyroxin wird die Eigensekretion von TSH bei den Mäusen blockiert. Das ebenfalls injizierte ^{125}J wird daher in der Schilddrüse zwar angereichert, jedoch nicht an Schilddrüsenhormon gebunden ausgeschieden. Erst nach Injektion von TSH oder LATS tritt, abhängig von der Dosis, eine Erhöhung des Schilddrüsenhormonspiegels im Blut der Versuchstiere ein.

Am 14. Tag beginnt der eigentliche Versuch:

- a) Man entnimmt durch retroorbitale Punktion mit einer Konstriktionspipette je Maus 0,1 ml Blut = sogenannter O-Wert.
- b) Danach werden 0,5 ml einer Eiweißlösung (Test- oder Kontrollsubstanz) in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse erhalten entweder Serum bzw. IgG von Patienten mit Morbus Basedow oder von Normalpersonen.
Bei einer Kontrollgruppe wird mit einer LATS-Standardlösung die Ansprechbarkeit der Tiere geprüft.
- c) 9 Stunden post injectionem werden wiederum je Maus 0,1 ml Blut entnommen = sogenannter 9-Stunden-Wert.

Die Blutproben werden jeweils in Plastikröhrchen mit 5 ml Aqua bidest. und Cialit (Verdünnung 1 : 10.000 w/v) vermischt.

Da vier Tage nach Injektion des Na^{125}J alles anorganische ^{125}J bereits durch die Niere ausgeschieden ist, entspricht die zu messende Aktivität des ^{125}J der proteingebundenen, d. h. an Schilddrüsenhormon gebundenen ^{125}J -Aktivität.

Die Radioaktivität der einzelnen Blutproben wird je 10 Minuten lang in einem Packard- γ -Counter-Probenwechsler registriert.

Bei den Proben mit der geringsten Aktivität beträgt die durch die Messung bedingte Standardabweichung 3 %, und zwar nach 10 Minuten Meßzeit und bei einem Background von 50 - 80 Impulsen/min.

Statistisch werden die Meßergebnisse in Anlehnung an die Methode zur Analyse von biologischen Versuchen für TSH und LH (Luteinisierendes Hormon) nach Sakize und Guillemin (60) ausgewertet.

1. Umformung der Impulsrate/10 min. in ihre logarithmischen Werte
2. Covarianzanalyse-"adjusted data" (BMD-Programm 04 y) (19)
3. F-Test zur Berechnung von P
4. Antilogarithmen-adjusted counts/10 min.

Folgende Werte sind zu berücksichtigen:

- a) 0-Wert (bei Start des eigentlichen Versuches vor der Injektion der Testsubstanz)
- b) 9-Stunden-Wert nach Injektion der Testsubstanz
- c) 9-Stunden-Wert nach Injektion der Kontrollsubstanz

LATS-Aktivität in der Testsubstanz wird angenommen, wenn der 9-Stunden-Wert der Testgruppe signifikant ($P < 0,05$) über dem der entsprechenden Kontrollgruppe liegt.

2.3. Sonstige Methoden zur diagnostischen Sicherung des Morbus Basedow

Um die Diagnose Hyperthyreose zu sichern, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 2.3.1. TRH-Stimulationstest
- 2.3.2. HTSH im Serum
- 2.3.3. Gesamtthyroxin im Serum (TT_4)
- 2.3.4. Trijodthyronin-Bindungsindex (TBI) (Hamolsky-Test)
- 2.3.5. Berechnung des "Freies-Thyroxin-Index" ($FT_4 I$)
aus 2.3.3. und 2.3.4.
- 2.3.6. Trijodthyronin im Serum (TT_3)
- 2.3.7. Schilddrüsenszintigraphie

Die laborchemischen Untersuchungen wurden durchgeführt im Labor Dr. Meinhold (HTSH, TT_3) bzw. im Routinelabor der Nuklearmedizinischen Abteilung im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin (TT_4 , Hamolsky-Test). Die Schilddrüsenszintigraphie wurde ebenfalls von der Nuklearmedizinischen Abteilung durchgeführt.

Die Diagnose Morbus Basedow wurde akzeptiert, wenn die Thyroxin- und/oder Trijodthyroninspiegel im Serum erhöht waren, der TRH-Test negativ ausfiel und sich im Schilddrüsenzintigramm eine gleichmäßige bilaterale Speicherung zeigte.

Zu 2.3.1.

Beim TRH-Stimulationstest wird die TSH-Konzentration im Patientenserum vor und nach Stimulierung mit "Thyreotropin-Releasing Hormone" (TRH) radioimmunologisch bestimmt. Der TRH-Test wird morgens am nüchternen, liegenden Patienten vorgenommen. 400 µg TRH (Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main) werden in eine Kubitalvene injiziert und Blutproben zum Zeitpunkt 0 und 30 Minuten post injectionem entnommen. Die Resultate des TRH-Tests werden nach den Ergebnissen von Wenzel et al. (74) ausgewertet, wobei "alters- und geschlechtsspezifische Normalgrenzen" zu berücksichtigen sind. Der TSH-Anstieg ($\Delta TSH_{\max.}$) bei Männern zwischen 20 und 59 Jahren liegt nämlich signifikant niedriger als bei Frauen der gleichen Altersgruppe. Daraus ergeben sich folgende Normwerte als TSH-Antwort auf TRH-Belastung:

Geschlecht	Alter	$\Delta TSH_{\max.}$ [µU/ml]	$\pm$ Standard- abweichung [µU/ml]
männlich	20-39 Jahre	9,73	4,49
	40-59 Jahre	7,93	4,94
	60-81 Jahre	7,37	3,37
weiblich	20-39 Jahre	15,6	7,6
	40-59 Jahre	15,6	8,8
	60-85 Jahre	7,7	3,7

Für Frauen unter oralen Antikonzeptiva gelten die gleichen Werte wie oben angegeben.

Wenzel et al. (74) schlagen vor, "zur Eingrenzung der Normalbereiche den 2fachen Wert der Standardabweichung und nicht den 3fachen Wert der mittleren Streuung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) zu verwenden".

Zu 2.3.2.

Die TSH-Konzentration im Serum wird radioimmunologisch bestimmt nach der modifizierten Methode nach Odell et al. (56). Nach Präinkubation des Patientenserums (unbekannte Menge an TSH) mit ^{125}J -markiertem menschlichem TSH (HTSH) wird es versetzt mit Anti-HTSH-Serum. Während der Inkubationszeit binden sich nichtmarkiertes TSH und markiertes HTSH je nach ihrer vorliegenden Konzentration an die Antikörper. Mit Hilfe eines Doppel-Antikörpers werden die TSH-Antikörper-Komplexe von nichtgebundenem markiertem und nicht-markiertem TSH getrennt. Anhand einer Eichkurve, die mit Standardkonzentrationen an TSH erstellt wurde, kann der TSH-Gehalt des Patientenserums ermittelt werden. Der Normalbereich liegt zwischen $< 0,8$ und $6,5 \mu\text{U/ml}$ Serum (Bogner (9)).

Zu 2.3.3.

Die Bestimmung des Gesamtthyroxins im Serum (TT_4) wird in der kompetitiven Proteinbindungsanalyse nach einer modifizierten Methode von Herrmann et al. (28) durchgeführt. Es handelt sich um einen In-vitro-Test (Kit: "Tetrasorb", Fa. Abbott, Eschborn/TS), bei dem aus dem Patientenserum das Thyroxin durch Alkohol extrahiert und versetzt wird mit thyroxinbindendem Globulin (TBG), das mit ^{125}J -markiertem Thyroxin ($^{125}\text{J-T}_4$) beladen ist. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, so daß proportional zur Thyroxinmenge im Serum des Patienten eine bestimmte Menge $^{125}\text{J-T}_4$ aus seiner Bindung an TBG freigesetzt wird. Man entfernt das ungebundene $^{125}\text{J-T}_4$ und bestimmt dann den Prozentsatz der Radioaktivität des am TBG verbliebenen $^{125}\text{J-T}_4$. Die Menge des Thyroxins im Patientenserum ist umgekehrt proportional der gemessenen Radioaktivität und ist aus einer Eichkurve zu bestimmen. Der Normalbereich liegt bei $53 - 145 \mu\text{g/l}$ Serum.

Zu 2.3.4.

Der Trijodthyronin-Bindungsindex (TBI) (auch Hamolsky-Test genannt) berücksichtigt die prozentuale Bindung des Trijodthyronins (T_3) an Serumproteine wie TBG. Er wird durch das

Testbesteck "Thyopac-3" (Radiochem. Ctr., Amersham) ermittelt. Man fügt einer Patientenserumprobe ^{125}J -markiertes Trijodthyronin ($^{125}\text{J-T}_3$) zu, das sich je nach Anzahl der freien Bindungsstellen an die Schilddrüsenhormon-bindenden Serumproteine bindet. Das nicht gebundene $^{125}\text{J-T}_3$ wird mittels Anionenaustauscher entfernt.

Der Index (TBI) wird errechnet, indem man die gemessene Radioaktivität im Patientenserum durch den Wert eines gleichfalls getesteten euthyreoten Standardserums dividiert. Bei euthyreoter Stoffwechsellage ergibt sich der Index von 1,0 (Normbereich 0,92 - 1,22). Bei hyperthyreoten Patienten ist die Anzahl der freien Bindungsstellen an Serumproteinen für $^{125}\text{J-T}_3$ herabgesetzt und die gemessene Radioaktivität geringer, so daß der Index bei dieser Methode $< 0,92$ wird.

Zu 2.3.5.

Da das freie Thyroxin (T_4) nur schwer durch Dialyse zu bestimmen ist, benutzt man stattdessen den damit grob korrelierenden "Freies-Thyroxin-Index" (FT_4I). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß zum einen die Konzentration von freiem T_4 der totalen T_4 -Konzentration direkt proportional und der Anzahl der unbesetzten Bindungsstellen am TBG umgekehrt proportional ist, daß zum anderen aber der Trijodthyronin-Bindungsindex direkt von den unbesetzten Bindungsstellen am TBG abhängt. Das heißt also, daß die Konzentration an freiem T_4 sowohl dem Gesamtthyroxin als auch dem Trijodthyronin-Bindungsindex proportional ist. So ist also der Quotient aus Gesamtthyroxin durch Hamolsky-Test ein errechneter Index für das freie Thyroxin und damit ein Maß für den jeweiligen Schilddrüsenfunktionszustand (Normalbereich 42 - 158).

Zu 2.3.6.

Da auch Hyperthyreosen durch alleinige T_3 -Erhöhung vorkommen, wird die Konzentration des Trijodthyronins im Serum (TT_3) radioimmunologisch nach der Doppel-Antikörpermethode bestimmt und ausgewertet nach Meinhold und Wenzel (52).

Das Patientenserum wird mit $^{125}\text{J-T}_3$ und einem T_3 -Antiserum unter Anwesenheit von Anilin-Naphthalin-Sulfonsäure, die die

Bindung des T_3 an TBG verhindert, versetzt. Nach einer Inkubationszeit werden die T_3 -Antikörper-Komplexe vom nichtgebundenen, freien T_3 durch einen weiteren Antikörper getrennt. Anhand einer Standardkurve wird die Konzentration des Trijodthyronins im Patientenserum festgelegt. Der Normalbereich liegt zwischen 0,68 und 1,80 ng/ml.

Zu 2.3.7.

Die Schilddrüsenszintigraphie wird mit ^{99m}Tc -Pertechnetat durchgeführt.

Zeigt das Schilddrüsenszintigramm eine gleichmäßige bilaterale Speicherung, so wird bei gleichzeitig bestehender hyperthyreoter Funktionslage die Diagnose Morbus Basedow angenommen.

3. R E S U L T A T E

3.1. Standardkurve für TSH im Radioliganden-Rezeptor-Versuch

Durch die Zugabe steigender Mengen von nicht markiertem TSH im Radioliganden-Rezeptor-Versuch wurde die Bindung von ^{125}J -TSH an die Schilddrüsenmembranen verhindert (Abb. 1). Bei Zugabe von weniger als 100 μU TSH/Versuchsansatz wird die Bindung des markierten TSH praktisch nicht mehr inhibiert. Dieser Versuch zeigt, daß die untere Nachweisgrenze des Radioliganden-Rezeptor-Versuches nach dem hier gezeigten Aufbau bei Werten bis zu 100 μU TSH/Versuchsansatz liegt.

3.2. Standardkurve für LATS im Radioliganden-Rezeptor-Versuch

Durch Austestung einer Verdünnungsreihe von LATS-aktivem IgG (Verdünnung durch IgG von Normalpersonen) im Radioliganden-Rezeptor-Versuch wird demonstriert, daß steigende Mengen von LATS-aktivem IgG zu einer Inhibierung der Bindung von ^{125}J -TSH an Schilddrüsenmembran-Präparationen führen (Abb. 2).

3.3. Beispiel eines Radioliganden-Rezeptor-Versuches

Als Beispiel für einen Radioliganden-Rezeptor-Versuch mit Patienten-IgG sei hier der Versuch vom 29. 5. 1975 mit seinen Ergebnissen gezeigt (Abb. 3).

Die 5 Normal-IgG-Proben ergaben eine mittlere Bindung von 13,6 %, Standardabweichung 0,55 %. Die Proben mit Patienten-IgG sind als positiv zu betrachten, wenn sie unter dem Mittelwert der Normal-IgG-Proben minus zweifacher Standardabweichung liegen.

Die unspezifische Bindung beträgt 0,9 % bei 400 mU TSH/Versuchsansatz.

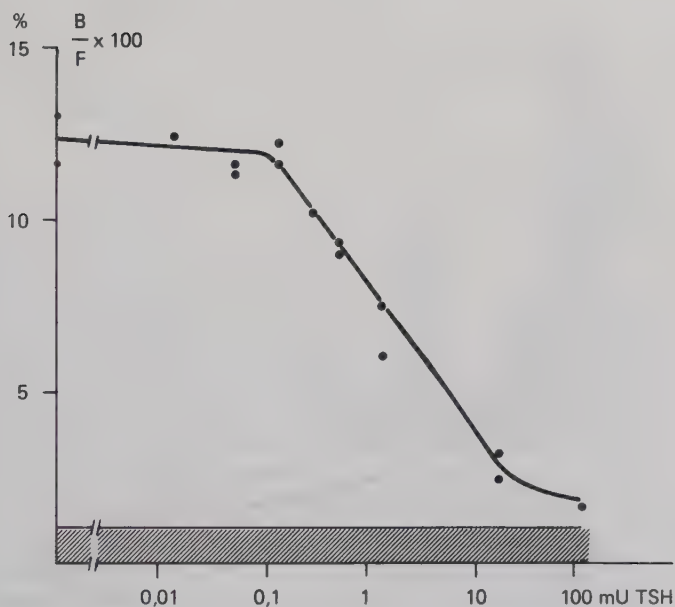


Abb. 1

Standardkurve für TSH im Radioliganden-Rezeptor-Versuch

Auf der Abszisse sind die Mengen von TSH im Inkubationsansatz (520 μ l) angegeben. Die Ordinate gibt die Bindung $\frac{B}{F} \times 100 = \frac{\text{cpm (Sediment)}}{\text{cpm (Überstand)}} \times 100 [\%]$ an. Der schraffierte Bereich zeigt die unspezifische Bindung, gemessen mit einem Überschuß an TSH (400 mU) im Inkubationsansatz.

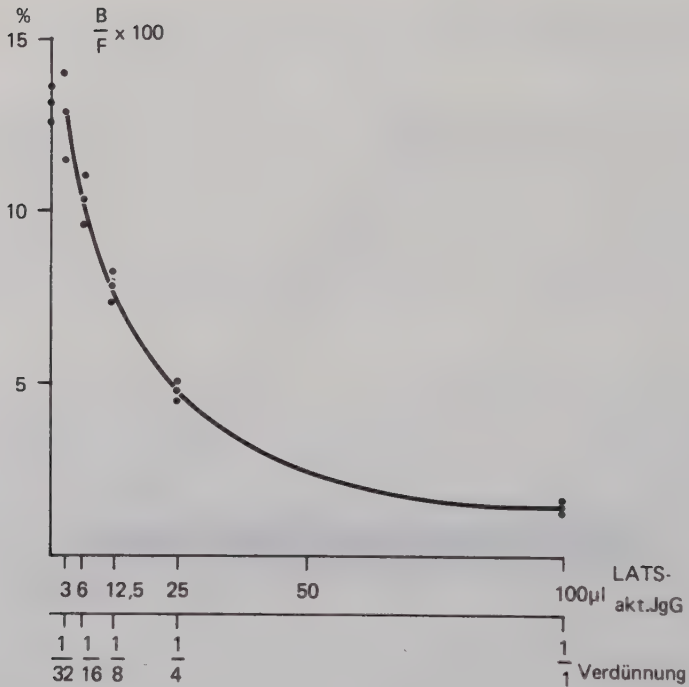


Abb. 2

Standardkurve für LATS im Radioliganden-Rezeptor-Versuch

Die Abszisse gibt die Mengen des LATS-aktiven IgG pro Versuchsansatz (520 µl) an (Verdünnungen von 1:1 bis 1:32 mit IgG von Normalpersonen). Auf der Ordinate ist die Bindung $\frac{B}{F} \times 100 = \frac{\text{cpm (Sediment)}}{\text{cpm (Überstand)}} \times 100 [\%]$ aufgetragen.

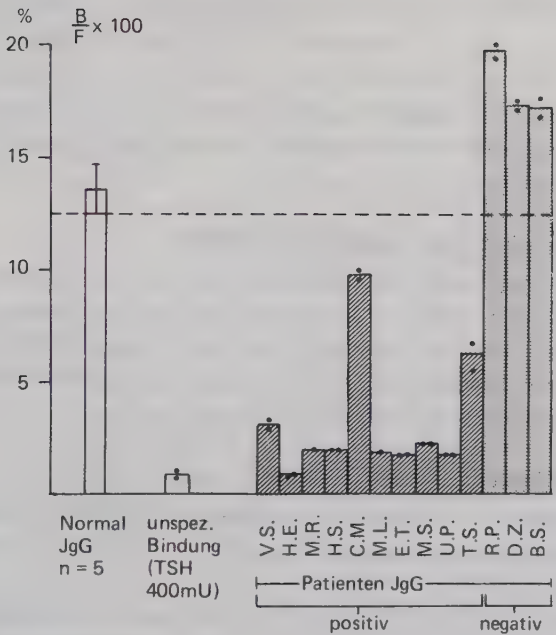


Abb. 3

Radioliganden-Rezeptor-Versuch vom 29. 5. 1975

Angegeben ist die Bindung $\frac{B}{F} \times 100 = \frac{\text{cpm (Sediment)}}{\text{cpm (Überstand)}} \times 100 [\%]$.

Bei den Proben mit Normal-IgG ist der Mittelwert von 5 Proben angegeben sowie die zweifache Standardabweichung. Die unspezifische Bindung wird durch 400 mU TSH im Inkubationsansatz festgestellt

Von den Proben mit Patienten-IgG sind 10 als positiv (schraffiert) und 3 als negativ (punktiert) zu bewerten (unterste Normalbereichsgrenze = Mittelwert der Normal-IgG-Proben minus zweifacher Standardabweichung).

3.4. Ergebnisse der Radioliganden-Rezeptor-Versuche

Insgesamt wurden 61 Patienten mit Morbus Basedow untersucht (Tab. 1). 33 von ihnen waren im Radioliganden-Rezeptor-Versuch positiv, 28 negativ. Das heißt, bei 54 % konnten im Radioliganden-Rezeptor-Versuch thyreotrope Immunglobuline nachgewiesen werden.

3.5. Ergebnisse der McKenzie-Versuche

Es wurden insgesamt 43 Patienten mit Morbus Basedow untersucht (Tab. 2). Bei 12 Patienten fiel der McKenzie-Versuch positiv aus, bei 31 negativ. Das heißt, bei 28 % konnte der Nachweis von Immunglobulinen, die sich an Mäuseschilddrüsen binden und sie stimulieren, erbracht werden.

3.6. Ergebnisse bei Testung nach beiden Methoden

Bei insgesamt 41 Patienten mit Morbus Basedow wurden sowohl der Radioliganden-Rezeptor-Versuch als auch der McKenzie-Versuch durchgeführt (Tab. 3).

Davon lieferten bei 8 Fällen (20 %) beide Versuche positive Ergebnisse, während in 17 Fällen (41 %) beide Tests negativ ausfielen.

Bei 12 Patienten (29 %) wurden im Radioliganden-Rezeptor-Versuch thyreotrope Antikörper nachgewiesen, die nicht im McKenzie-Versuch nachweisbar waren. Und umgekehrt wurden bei 4 Patienten (10 %) die im McKenzie-Versuch positiv nachgewiesenen thyreotropen Immunglobuline im Radioliganden-Rezeptor-Versuch nicht bestätigt.

Aus dieser letzten Patientengruppe zeigt Abb. 4 die Ergebnisse für zwei Patienten (Lo, Da) nach Testung der Seren auf thyreotrope Antikörper im Radioliganden-Rezeptor-Versuch und im McKenzie-Versuch (Schleusener et al. (62)). Als Vergleich sind die Werte eines Patienten (VS) angegeben, bei dem beide Tests positiv ausfielen.

Tab. 1

Radioliganden-Rezeptor-Versuche

Ergebnisse	n	%
positiv	33	54
negativ	28	46
	61	100

Tab. 2

McKenzie-Versuche

Ergebnisse	n	%
positiv	12	28
negativ	31	72
	43	100

Tab. 3

Ergebnisse bei Testung nach beiden Methoden

Ergebnis Radiolig. Rez.Vers.	Ergebnis McKenzie- Versuch	n	%
positiv	positiv	8	20
negativ	negativ	17	41
negativ	positiv	4	10
positiv	negativ	12	29
		41	100

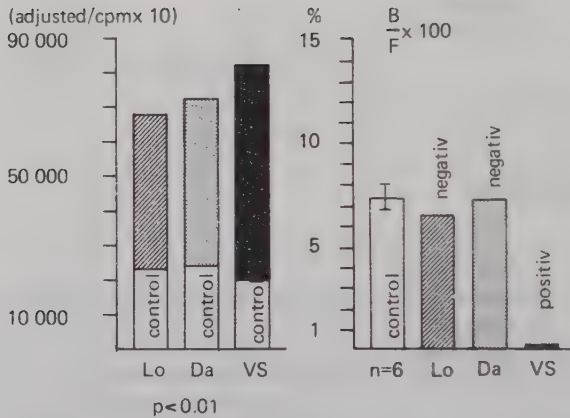


Abb. 4

Vergleich der Ergebnisse von 2 Patienten mit unbehandeltem Morbus Basedow (Lo, Da) und von einem Patienten mit prätibialem Myxödem (VS) im McKenzie-Versuch (links) und im Radioliganden-Rezeptor-Versuch (rechts). IgG von Normalpersonen diente als Kontrolle. Im Radioliganden-Rezeptor-Versuch ist die Standardabweichung bei den Werten für Normal-IgG eingezeichnet. Als positiv gelten Seren, deren Werte unter dem Kontrollwert minus zweifacher Standardabweichung liegen.

3.7. Ergebnisse der sonstigen klinischen Untersuchungen

Von 31 Patienten mit aktiver unbehandelter Hyperthyreose zeigten 15 (48 %) einen positiven Radioliganden-Rezeptor-Versuch (Gruppe A, Tab. 4) und 16 (52 %) einen negativen Radioliganden-Rezeptor-Versuch (Gruppe B, Tab. 5).

Für den "Freies-Thyroxin-Index" (FT_4I) betrugen bei der Gruppe A der Mittelwert $\bar{x} = 185,4$, Standardabweichung (SD) 77,0, und bei Gruppe B Mittelwert $\bar{x} = 176,8$, Standardabweichung (SD) 76,0. Der Student-Test (t-Test) ergab $0,35 < P < 0,40$, also nicht signifikant (Auswertung nach "Signifikanzschränken der Student-Verteilung" in Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen (18)).

Für die Konzentration von Trijodthyronin im Serum (TT_3) ergaben sich bei Gruppe A ein Mittelwert $\bar{x} = 3,77$ ng/ml, Standardabweichung 1,73 ng/ml, und bei Gruppe B Mittelwert $\bar{x} = 3,37$ ng/ml, Standardabweichung 1,96 ng/ml. Der Student-Test ergab $0,25 < P < 0,30$, d. h. nicht signifikant.

In fünf Einzelfällen war der Radioliganden-Rezeptor-Versuch positiv trotz euthyreoter Stoffwechsellaage (positiver TRH-Stimulationstest 6 Wochen nach Absetzen einer langfristigen thyreostatischen Behandlung) (Gruppe C, Tab. 6).

Tab. 4

Klinische Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit aktiver unbehandelter Hyperthyreose und positivem Radioliganden-Rezeptor-Versuch (Gruppe A)

Patienten n = 15	Hamolsky-Test	FT ₄ I	TT ₃ [ng/ml]
H. J.	0,71	254	6,20
M. W.	0,90	150	5,25
A. F.	0,67	313	6,00
U. P.	1,10	100	1,00
G. S.	0,90	153	5,18
G. W.	1,13	118	2,40
H. T.	1,02	118	2,70
K. F.	0,88	210	2,67
H. E.	0,73	338	5,10
H. S.	1,06	189	3,20
G. R.	0,90	130	3,60
C. C.	0,87	173	2,20
I. R.	1,08	144	4,20
V. S.	0,99	111	1,20
E. K.	0,71	280	5,65
Mittelwert $\bar{x}$		185,4	3,77
Standardabweichung		77,0	1,73

Tab. 5

Klinische Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit aktiver unbehandelter Hyperthyreose und negativem Radioliganden-Rezeptor-Versuch (Gruppe B)

Patienten n = 16	Hamolsky-Test	FT ₄ ^I	TT ₃ [ng/ml]
F. D.	0,77	171	3,55
J. D.	-	242	4,17
M. S.	1,14	122	1,70
E. G.	0,86	174	2,67
E. S.	0,94	103	1,86
M. S.	0,59	291	5,90
C. M.	0,81	157	6,89
I. L.	0,99	190	3,37
D. Z.	1,08	53	1,06
B. S.	0,65	359	7,30
E. R.	0,73	237	4,90
G. T.	0,93	151	2,97
M. B.	1,15	117	1,90
I. L.	0,80	188	1,21
G. R.	0,92	154	2,56
K. H.	1,06	120	1,97
Mittelwert $\bar{x}$		176,8	3,37
Standardabweichung		76,0	1,96

Tab. 6

Klinische Untersuchungsergebnisse von 5 Patienten mit positivem Radioliganden-Rezeptor-Versuch und positivem TRH-Stimulationstest (6 Wochen nach Absetzen einer langfristigen thyreostatischen Behandlung) (Gruppe C)

Patienten n = 5	Hamolsky- Test	FT ₄ I	TT ₃ [ng/ml]	TRH-Test TSH [µU/ml] vor/30 Min. nach TRH-Gabe
I. B.	1,17	55	1,12	6/32
C. M.	1,33	74	2,09	3,5/16
M. S.	1,32	72	1,50	3/23
U. L.	1,24	92	0,73	0,9/4
C. M.	1,12	95	1,37	1/4,5

4. DISKUSSION

Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, daß der Morbus Basedow eine genetisch determinierte, autoimmunologisch ausgelöste Erkrankung ist (Buchanan et al. (11), Fialkow (23), Wall et al. (72), Gunn et al. (26), Michie et al. (53), Werner et al. (76), Schleusener und Schimmelpfennig (61), Werner und Platman (75)). Strittig ist, ob humorale thyreotrope Antikörper allein für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich sind. Denn nur bei einem Teil der Patienten mit Morbus Basedow kann das schilddrüsenstimulierende Immunglobulin LATS im McKenzie-Versuch nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf der geringen Empfindlichkeit des Tests beruht (Carneiro (15)). Das Vorkommen von LATS bei Patienten trotz suppressibarer Schilddrüsenfunktion spricht ebenfalls gegen eine Verursachung des Morbus Basedow durch LATS.

Adams und Kennedy (2) bewiesen mit einer indirekten Methode als erste die Existenz von thyreotropen Antikörpern (LATS-Protector oder HTSI), die zwar die menschliche Schilddrüse stimulierten, die aber nicht im McKenzie-Mäuseversuch nachweisbar waren. Die negativen Ergebnisse im Mäuseversuch würden sich durch die eventuell artgebundene Spezifität der Antikörper ergeben.

Im Radioliganden-Rezeptor-Versuch, der auf der Inhibierung der Bindung von $^{125}\text{J-TSH}$ an menschliche Schilddrüsenzellmembranen durch thyreotrope Antikörper beruht, konnte zum ersten Mal die Bindung von thyreotropen Immunglobulinen an die Schilddrüsenmembran des Menschen nachgewiesen werden. Mit diesem Versuchssystem fanden wir thyreotrope Antikörper bei 54 % der unbehandelten Patienten mit diagnostisch gesichertem Morbus Basedow (siehe Tab. 1)

Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Resultaten anderer Autoren:

Adams et al. (3) sowie Kendall-Taylor et al. (32) berichten über positive Nachweise von thyreotropen Immunglobulinen

bei 90 bzw. 86 % der Fälle mit Hilfe ihres LATS-Protector-Versuches. Mukhtar et al. (55) erzielten in ihrem Radioliganden-Rezeptor-Versuch bei 100 % der untersuchten 56 Patienten mit unbehandeltem Morbus Basedow einen positiven Nachweis von thyreotropen Immunglobulinen. Jedoch zeigte ihre Methode eine untere Nachweisgrenze von 10 μ U TSH/Versuchsansatz (Smith und Hall (67)).

Wir erreichten eine Empfindlichkeit im Radioliganden-Rezeptor-Versuch bis zur unteren Grenze von 100 μ U TSH/Versuchsansatz. Bei Zugabe von weniger als 100 μ U TSH im Inkubationsansatz (520 μ l) trat keine gesteigerte Inhibierung der Bindung von ^{125}J -TSH ein (siehe Standardkurve für TSH, Abb. 1). Die Dosisabhängigkeit wird in einer Standardkurve für LATS-aktives IgG demonstriert (siehe Abb. 2).

Die Diskrepanz in der Häufigkeit der nachgewiesenen thyreotropen Immunglobuline beruht nur zum Teil auf der geringen Empfindlichkeit unserer Methode zum Radioliganden-Rezeptor-Versuch. Bis zur Niederschrift dieser Arbeit sind die Methoden in unserem Labor modifiziert worden, so daß nunmehr eine Empfindlichkeit von 5 - 10 μ U TSH/Versuchsansatz erreicht wird. Trotzdem sind nur bei 50 % der Patienten thyreotrope Antikörper nachweisbar (Finke et al. (25)). Hierbei fällt auf, daß bei den Proben mit IgG von Normalpersonen die Variationsbreite in der Inhibierung der Bindung von ^{125}J -TSH wesentlich größer war als bei Mukhtar et al. (55). Dadurch entsteht eine "Grauzone" zwischen den normalen und pathologischen Werten. Möglicherweise ist dieser Befund auf den unspezifischen Einfluß von Plasmaproteinen zurückzuführen, die die Schilddrüsenzellmembran sterisch verändern, wodurch sich die Anzahl der Rezeptoren für TSH und andere thyreotrope Substanzen verringert (Bashford et al. (8)) (siehe Abb. 5).

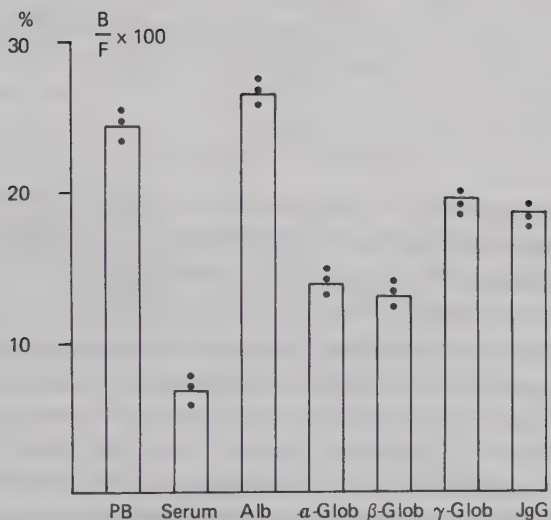


Abb. 5

Einfluß der verschiedenen Serum-Proteinfractionen im Radioliganden-Rezeptor-Versuch auf die Bindung von ^{125}J -TSH an 700 - 25.000 x g - Membranfraktionen (zitiert nach I. Kruck und G. Kruck (36)).

Die Proteinfractionen wurden inkubiert mit 20.000 cpm ^{125}J -TSH in 300 µl 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit 0,02 M NaCl, pH 7,5 (= PB), für 2 Stunden bei 37 °C. Die Proteinkonzentration/Versuchsansatz betrug 7 mg für Serum, 4 mg für Albumin und 2,2 mg für die Globulinfraktionen. PB ist der Kontrollwert ohne Protein.

Auch unter Einschluß der Grenzfälle bei Berücksichtigung der "Grauzone" wurde keine Häufigkeit von thyreotropen Antikörpern über 70 % nachgewiesen (Finke et al. (25)).

Die Ergebnisse anderer Autoren sind schwieriger zu vergleichen, weil sie nicht mit menschlichen Schilddrüsenzellmembranen erzielt wurden (Manley et al. (44), Verrier et al. (69), Amir et al. (6)).

Der Radioliganden-Rezeptor-Versuch zeigt lediglich, daß sich thyreotrope Antikörper an menschliche Schilddrüsenzellmembranen binden. Daß sie auch die menschliche Schilddrüse stimulieren, wurde schon mehrfach bewiesen:

Arnaud et al. (7) zeigten in einem In-vivo-Experiment, daß es nach Infusion von LATS-aktivem Serum 12 Stunden später zu einer maximalen Steigerung der Schilddrüsenhormonsekretion kam, die nach 3 Tagen noch immer nicht zur Norm zurückgekehrt war. Adams et al. (4) fanden eine Stimulation humaner Schilddrüsen in vivo nach Infusion von LATS-Protector-Plasma (Anstieg des ^{125}J -Spiegels im Blut der Probanden nach Vorbehandlung mit ^{125}J und Trijodthyronin). Shishiba et al. (64) stellten fest, daß LATS-Protector menschliche Schilddrüsen-schnitte zu verstärkter Endozytose anregt.

Ein empfindlicher Indikator zum Nachweis der Schilddrüsenstimulation ist das Adenylzyklase-cAMP-System. Mehrere Forschungsgruppen (Burke (14), Kaneko et al. (30), Levey und Pastan (40), Yamashita und Field (78)) beobachteten, daß LATS in vitro eine erhöhte Adenylzyklase-Aktivität hervorrief, nachgewiesen durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration. Kendall-Taylor (31) fand ebenfalls eine cAMP-Erhöhung durch LATS, jedoch nicht durch LATS-Protector.

Andere Autoren weisen ebenfalls eine Erhöhung der Adenylzyklase-Aktivität in vitro nach: Mukhtar et al. (55) bei 11 von 17 Fällen unbehandelter Patienten mit thyreotropen Immunglobulinen (nachgewiesen im Radioliganden-Rezeptor-

Versuch) und Orgiazzi et al. (58) bei 9 von 15 Patienten-IgG-Proben (keine LATS-Aktivität im McKenzie-Versuch). Diese Ergebnisse wurden mit fraktionierten Schilddrüsenhomogenaten erzielt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß durch den Homogenisierungsvorgang ein Teil des Rezeptor-Transducer-Adenylzyklase-Systems zerstört wurde. Bei Benutzung von menschlichen Schilddrüsen Schnitten ist es McKenzie und Zakarija (49) gelungen, mit dem IgG aller 20 untersuchten Patienten eine Adenylzyklase-Stimulierung zu erreichen.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um festzustellen, wie Bindung thyreotroper Immunglobuline an den Rezeptor und Stimulierung der Adenylzyklase miteinander korrelieren. Es wird daher vorgeschlagen, bis zur endgültigen Klärung der Sachlage nur den neutralen Begriff "thyreotrope" Immunglobuline zu benutzen anstelle von "Thyroid Stimulating Immunoglobulins".

Im Radioliganden-Rezeptor-Versuch wurden bei 54 % der Basedow-Patienten thyreotrope Immunglobuline nachgewiesen (siehe Tab. 1), im McKenzie-Versuch hingegen nur bei 28 % (siehe Tab. 2). Dies zeigt, daß der Radioliganden-Rezeptor-Versuch dem McKenzie-Versuch überlegen ist im Nachweis von thyreotropen Antikörpern.

Es wurde weiterhin ein Kollektiv von 41 Patienten nach beiden Versuchsmethoden überprüft (siehe Tab. 3). Hierbei zeigten 20 % der Proben positive Ergebnisse und 41 % negative Ergebnisse in beiden Methoden, d. h. bei 61 % stimmten die Resultate überein.

Diskrepanzen zeigten sich bei den restlichen 39 % der Fälle. 29 % hatten ein positives Ergebnis im Radioliganden-Rezeptor-Versuch, obwohl sie im McKenzie-Versuch negativ waren. Hier kann es infolge der spezifisch menschlichen Antikörper zu keiner Stimulierung der Mäuseschilddrüse gekommen sein, während die Bindung an menschliche Schild-

drüsenzellmembranen die speziegebundene Affinität der thyreotropen Immunglobuline unterstreicht.

Umgekehrt war bei 10 % der Fälle der Radioliganden-Rezeptor-Versuch negativ, obwohl sie im McKenzie-Versuch positive Ergebnisse zeigten. Trotz der meßbaren Stimulierung der Mäuseschilddrüse war im Versuchssystem mit menschlichen Schilddrüsenmembranen keine Bindung nachweisbar.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die thyreotropen Antikörper eine nicht homogene Gruppe bilden. Ihre Heterogenität würde ihre unterschiedliche Bindungs- und Stimulierungspotenz erklären, wobei die Spezifität eine nicht unerhebliche Rolle spielt.

Weitere Hinweise auf die Heterogenität der thyreotropen Immunglobuline finden sich bei folgenden Forschungsgruppen: Kriss (35) berichtete, daß LATS teils durch Antiserum gegen Lambda-Ketten und teils durch Antiserum gegen Kappa-Ketten inaktiviert wurde. Smith et al. (66) fanden bei Chromatographie von Seren über DEAE-Sephadex zwei Zonen mit LATS-Aktivität: langsam wanderndes Gamma-G-Globulin und eine Zone mit verschiedenen Serumproteinen einschließlich schnellem Gamma-G-Globulin. Adlkofer et al. (5) wiesen bei Isoelektrofokussierung LATS-Aktivität der IgG-Subfraktionen in pH-Bereichen von 7,5 bis 9,5 nach.

McKenzie und Zakarija (49) führen die unterschiedlichen Ergebnisse darauf zurück, daß es sich hierbei um Variationen ein und desselben Antikörpers handelt mit einem gemeinsamen hypothetischen Antigen in der Schilddrüsenzellmembran.

Nimmt man eine Heterogenität der thyreotropen Antikörper an, so könnten auch frühere Befunde neu eingestuft werden: Einige Autorengruppen (Chopra et al. (16, 17), Silverstein und Burke (65), Wong und Doe (77), Hennemann et al. (27)) beschreiben Fälle, in denen trotz LATS-Aktivität im Serum die Jodspeicherung in der Schilddrüse durch Schilddrüsenhormongabe supprimiert werden konnte. Dieser Befund sprach

bisher gegen eine pathogenetische Rolle von LATS bei Morbus Basedow. Unter dem Aspekt der Heterogenität der Antikörper könnten diese Befunde jedoch dadurch erklärt werden, daß nach der thyreostatischen Behandlung im Patientenserum nur noch LATS-Moleküle vorhanden waren, die eine geringere Affinität zur menschlichen als zur Mäuse-Schilddrüsenzellmembran hatten.

Auf der anderen Seite schließt ein negativer Ausfall des Radioliganden-Rezeptor-Versuches die Anwesenheit von thyreotropen Antikörpern nicht aus, die zwar wegen ihrer geringen Menge im Versuchssystem nicht nachweisbar sind, die aber potent genug sind, zu einer nicht supprimierbaren Schilddrüsenstimulierung zu führen (McKenzie und Zakarija (49)).

Von 31 Patienten mit aktivem unbehandeltem Morbus Basedow hatten im Radioliganden-Rezeptor-Versuch 48 % positive Ergebnisse (Gruppe A, siehe Tab. 4) und 52 % negative Ergebnisse (Gruppe B, siehe Tab. 5). Zu beiden Gruppen A und B liegen die Ergebnisse der sonstigen klinischen Untersuchungen vor (Hamolsky-Test, "Freies-Thyroxin-Index" (FT_4I) und Trijodthyronin im Serum (TT_3)) (siehe Tab. 4 und 5). Beim Vergleich der Gruppen-Mittelwerte für FT_4I und TT_3 ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchungsmethoden korrelieren nicht mit den Ergebnissen des Radioliganden-Rezeptor-Versuches und können auch nicht dessen unterschiedliches Ausfallen erklären.

Bei 5 Patienten, die 6 Wochen nach Absetzen einer langfristigen thyreostatischen Behandlung einen positiven TRH-Stimulationstest aufwiesen (Gruppe C, siehe Tab. 6), konnten im Radioliganden-Rezeptor-Versuch thyreotrope Antikörper nachgewiesen werden. Es wurde jedoch kein Suppressionstest (Schilddrüsenzintigramm nach Gabe von L-Thyroxin) durchgeführt, so daß der Beweis einer echten Remission

nicht erbracht ist. Eventuell war auch der behandlungsfreie Zeitraum von 6 Wochen zu kurz. Eine andere Erklärung der normalen TRH-Test-Ergebnisse bei positivem Radioliganden-Rezeptor-Versuch wäre in einer gleichzeitig bestehenden Hashimoto-Thyreoiditis zu suchen, die eine Überproduktion von T_4 und/oder T_3 in der Schilddrüse verhindert und so die Patienten vor einer erneuten hyperthyreoten Stoffwechsellaage bewahrt (Fatourechí et al. (22), McKenzie und Zakarija (49)). Wenn man eine heterogene Gruppe von Antikörpern annimmt, lassen sich jedoch die Befunde durch Anwesenheit von Antikörpern erklären, die zwar an die menschliche Schilddrüsenzellmembran binden, die die Schilddrüse in vivo aber nicht zu stimulieren vermögen.

Finke et al. (25) fanden aus einer Gruppe von 27 Patienten mit supprimierbarer Schilddrüsenfunktion in 3 Fällen einen positiven Radioliganden-Rezeptor-Versuch. Dies Ergebnis stützt die These, daß sich die thyreotropen Antikörper an die menschliche Schilddrüse binden, ohne sie zu stimulieren, obwohl diese Annahme durch funktionelle In-vitro-Tests (Messen der cAMP-Konzentration in menschlichen Schilddrüsen-schnitten) noch belegt werden müßte.

Die Theorie der alleinigen pathogenetischen Rolle humoraler thyreotroper Antikörper für den Morbus Basedow schließt die Möglichkeit nicht aus, daß primär eine zellulär gebundene Immunität auftritt, die erst sekundär zur Bildung humoraler thyreotroper Immunglobuline durch B-Lymphozyten führt (Volpé et al. (71)).

Volpé et al. (70) diskutieren seit längerem, daß ständig Basedow-spezifische "forbidden clones" gebildet werden und daß auf Grund einer genetisch bedingten Schwäche im Überwachungssystem ("Surveillance") bei Hinzutreten weiterer Faktoren wie Streß diese "forbidden clones" nicht eliminiert werden können, sondern sich unkontrolliert vermehren und die daraus entstehenden T-Lymphozyten in die Schilddrüse wandern

und dort durch Reaktion mit dem entsprechenden Antigen eine Hyperthyreose induzieren. Nach Sensibilisierung durch ihr Antigen sollen die T-Lymphozyten auch die B-Lymphozyten zur Synthese und Sekretion humoraler thyreotroper Antikörper anregen.

Zur Stützung dieser Annahme dienen folgende Punkte:

- a) Lymphozyten von Basedow-Patienten mit LATS-positivem und LATS-negativem Serum stimulieren in vitro direkt die Jod-Aufnahme von Schilddrüsenzellen (Edmonds et al. (20)).
- b) Lymphozyten von Basedow-Patienten sezernieren nach Inkubation mit crudem Schilddrüsenextrakt den "Migration-Inhibition-Faktor" (MIF), der jedoch auch durch spezifische Antigene der Hashimoto-Thyreoiditis hervorgerufen wird (Lamki et al. (37), Volpé et al. (70)).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, daß der Morbus Basedow eine genetisch determinierte, autoimmunologisch ausgelöste Erkrankung ist. Strittig ist, ob humorale Antikörper die alleinige pathogenetische Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde die Häufigkeit thyreotroper Immunglobuline mit dem Radioliganden-Rezeptor-Versuch und dem McKenzie-Versuch untersucht und mit Ergebnissen der Schilddrüsen-Funktionstests verglichen.

Nachgewiesen wurden thyreotrope Antikörper bei aktivem unbehandeltem Morbus Basedow in 54 % mit dem Radioliganden-Rezeptor-Versuch und in 28 % mit dem McKenzie-Versuch.

Offen bleibt die Frage, ob der relativ geringe Prozentsatz auf mangelnde Empfindlichkeit des Versuchssystems oder auf das Fehlen von thyreotropen Antikörpern zurückzuführen ist.

Die Diskrepanz zwischen Untersuchungsergebnissen mit dem Radioliganden-Rezeptor-Versuch und dem McKenzie-Versuch und der Nachweis von thyreotropen Antikörpern im Radioliganden-Rezeptor-Versuch bei wahrscheinlich ausgeheiltem Morbus Basedow läßt auf eine Heterogenität der Antikörper schließen, wobei folgende Gruppen unterschieden werden können:

1. Antikörper, die zwar an die menschliche Schilddrüsenzellmembran binden, jedoch die Mäuseschilddrüse nicht stimulieren,
2. Antikörper, die die Mäuseschilddrüse stimulieren, im Versuchssystem mit menschlichen Schilddrüsenzellmembranen aber nicht nachweisbar sind, und
3. Antikörper, deren Bindung an menschliche Schilddrüsenzellmembranen im Radioliganden-Rezeptor-Versuch nachgewiesen wird, die aber in vivo die menschliche Schilddrüse nicht stimulieren können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Adams, D.D., und H.D. Purves:
Abnormal Responses in the Assay of Thyrotrophin,
Proc. Univ. Otago Med. School 34, 11 (1956)
- (2) Adams, D.D., und T.H. Kennedy:
Evidence to Suggest that LATS Protector Stimulates
the Human Thyroid Gland,
J. Clin. Endocr. 33, 47 (1971)
- (3) Adams, D.D., T.H. Kennedy und R.H.D. Stewart:
Correlation Between Long-Acting Thyroid Stimulator
Protector Level and Thyroid ^{131}J Uptake in Thyro-
toxicosis,
Brit. Med. J. 2, 199 (1974)
- (4) Adams, D.D., F.N. Fastier, J.B. Howie, T.H. Kennedy,
J.A. Kilpatrick und R.D.H. Stewart:
Stimulation of the Human Thyroid by Infusions of
Plasma Containing LATS Protector,
J. Clin. Endocr. 39, 826 (1974)
- (5) Adlkofer, F., H. Schleusener, L. Uher und A. Ananos:
Heterogeneity of Long Acting Thyroid Stimulating
(LATS) - Activity, Thyroglobulin Antibodies and
Thyroid Microsomal Antibodies,
Acta endo. 73, 483 (1973)
- (6) Amir, S.M., T.F. Carraway jr., L.D. Kohn und
R.J. Winand:
The Binding of Thyrotropin to Isolated Bovine
Thyroid Plasma Membranes,
J. biol. Chem. 248, 4092 (1973)
- (7) Arnaud, C.D., H.A. Kneubühler, V.L. Seiling,
B.K. Wightman und N.H. Engbring:
Responses of the Normal Human to Infusions of
Plasma from Patients with Graves' Disease,
J. Clin. Invest. 44, 1287 (1965)

- (8) Bashford, C.L., S.J. Harrison, G.K. Radda und
S.Q. Mehdi:
The Relation Between Lipid Mobility and the Specific
Hormone Binding of Thyroid Membranes,
Biochem. J. 146, 473 (1975)
- (9) Bogner, U.:
Methodik und klinische Anwendung der radioimmunolo-
gischen Bestimmung von Schilddrüsen-stimulierendem
Hormon (TSH),
Berlin, Freie Universität, Med. Diss. v. 28.8.74
- (10) Brown, J., J. Ensor und D.S. Munro:
A Comparison of the Actions of Thyroid-Stimulating
Hormone and the Long-acting Thyroid Stimulator in
an in vitro Assay,
Proc. Roy. Soc. Med. 61, 652 (1968)
- (11) Buchanan, W.W., W.D. Alexander, J. Crooks, D.A. Koutras,
E.J. Wayne, J.R. Anderson und R.B. Goudie:
Association of Thyrotoxicosis and Autoimmune
Thyroiditis,
Brit. Med. J. 1, 843 (1961)
- (12) Burke, G.:
Comparison of Early Effects of Thyrotropin and
Long-Acting Thyroid Stimulator on Thyroidal
Phospholipogenesis,
Endocrinology 83, 1210 (1968)
- (13) Burke, G.:
Comparative Effects of Thyrotropin and Long-acting
Thyroid Stimulator on Thyroidal Intermediary
Metabolism: Relationship to Pyridine Nucleotide
Levels,
Metabolism 18, 132 (1969)
- (14) Burke, G.:
The Cell Membrane: A Common Site of Action of
Thyrotropin (TSH) and Long-Acting Thyroid Stimulator
(LATS),
Metabolism 18, 720 (1969)

- (15) Carneiro, L., K.J. Dorrington und D.S. Munro:
Recovery of the Long-Acting Thyroid Stimulator from
Serum of Patients with Thyrotoxicosis by Concentration
of Immunoglobulin G,
Clin. Sci. 31, 215 (1966)
- (16) Chopra, I.J., D.H. Solomon, D.E. Johnson und U. Chopra:
Thyroid Gland in Graves' Disease: Victim or Culprit?
Metabolism 19, 760 (1970)
- (17) Chopra, I.J., D.H. Solomon, D.E. Johnson, U. Chopra
und D. S. Fisher:
Dissociation of Serum LATS Content and Thyroid
Suppressibility During Treatment of Hyperthyroidism,
J. Clin. Endocr. 30, 524 (1970)
- (18) Diem, K., und C. Lentner,
Herausgeber: J. R. Geigy AG, Pharma, Basel:
Signifikanzschranken der Student-Verteilung, in:
Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen,
7. Auflg. (1968), S. 32
- (19) Dixon, W.J.; BMD-Programm 04 y
ed. BMD Biomedical Computer Programs
Health Sciences Computing Facility,
University of California, Los Angeles (1964)
- (20) Edmonds, M.W., V.V. Row und R. Volpé:
Action of globulin and lymphocytes from peripheral
blood of patients with Graves' disease on isolated
bovine thyroid cells,
J. Clin. Endocr. 31, 480 (1970)
- (21) Elsas, L.J., R. Whittemore und G.N. Burrow:
Maternal and Neonatal Graves' Disease,
J. Am. Med. Ass. 200, 250 (1967)
- (22) Fatourechi, V., W.M. McCahey und L.B. Woolner:
Hyperthyroidism associated with histologic Hashi-
moto's thyroiditis,
Mayo Clinic Proc. 46, 682 (1971)

- (23) Fialkow, J.P.:
Genetic Aspects of Autoimmunity,
Prog.Med. Genetics 6, 117 (1969)
- (24) Field, J.B., A. Remer, G. Bloom und J.P. Kriss:
In Vitro Stimulation by Long-Acting Thyroid Stimulator
of Thyroid Glucose Oxidation and ^{32}P Incorporation
into Phospholipids,
J. Clin. Invest. 47, 1553 (1968)
- (25) Finke, R., H. Schleusener, P. Kotulla, H. Sörje, C.H. Kim,
K.W. Wenzel:
The Radioligand Receptor Assay for Graves' Disease
Immunoglobulins - A Prognostic Test ?
Acta endocr., Suppl., im Druck
- (26) Gunn, A., W. Michie und W.J. Irvine:
The Thymus in Thyroid Disease,
Lancet 2, 776 (1964)
- (27) Hennemann, C., A. Dolman, R. Docter, A. de Reis und
J. van Zije:
Dissociation of Serum LATS Activity and Hyperfunction
and Autonomy of the Thyroid Gland in Graves' Disease,
J. Clin. Endocr. 40, 935 (1975)
- (28) Herrmann, J., A. Brase, H. de Marées und H.L. Krüskemper:
Gesamtthyroxin im Serum,
Z. klin. Chem. 8, 605 (1970)
- (29) Hunter, W.M., und F.C. Greenwood:
A Radio-Immunoelectrophoretic Assay for Human
Growth Hormone,
Biochem. J. 91, 43 (1964)
- (30) Kaneko, T., U. Zor und J.B. Field:
Stimulation of Thyroid Adenyl Cyclase Activity and
Cyclic Adenosin 3',5'-Monophosphate by Long-acting
Thyroid Stimulator,
Metabolism, 19, 430 (1970)

- (31) Kendall-Taylor, P.:
Effects of Long-acting Thyroid Stimulator (LATS) and
LATS Protector on Human Thyroid Adenyl Cyclase Activity
Brit.Med.J. 3, 72 (1973)
- (32) Kendall-Taylor, P., S.M. Dirmikis und D.S. Munro:
Long-acting Thyroid Stimulators and Related Factors,
Proc. Roy. Soc. Med. 68, 252 (1975)
- (33) Kriss, J.P., V. Pleshakov und J.R. Chien:
Isolation and Identification of the LATS and Its
Relation to Hyperthyroidism and Corcumscribed Pre-
tibial Myxedema,
J. Clin. Endocr. 24, 1005 (1964)
- (34) Kriss, J.P., V. Pleshakov, A.L. Rosenblum, M. Holderness,
G. Sharp und R. Utiger:
Studies on the Pathogenesis of the Ophthalmopathy
of Graves' Disease,
J. Clin. Endocr. 27, 582 (1967)
- (35) Kriss, J.P.:
Inactivation of Long-Acting Thyroid Stimulator (LATS)
by Anti-kappa and Anti-lambda Antisera,
J. Clin. Endocrin. 28, 1440 (1968)
- (36) Kruck, I. und G. Kruck:
Radioliganden-Rezeptor-Assay für schilddrüsen-
stimulierende Faktoren,
Promotionsarbeit in Vorbereitung
- (37) Lamki, L., V.V. Row und R. Volpé:
Cell-Mediated Immunity in Graves' Disease and in
Hashimoto's Thyroiditis as Shown by the Demonstration
of Migration Inhibition Factor (MIF),
J. Clin. Endocr. 36, 358 (1973)
- (38) "Leading Article":
Hyperthyroidism and Graves' Disease,
Brit. Med. J. 2, 457 (1975)

- (39) Lepp, A., und L. Oliner:
Failure of Long-Acting Thyroid Stimulator Globulin
(LATS) and Serum To Stimulate Thyroid Function in
the Chick,
Endocrinology 80, 369 (1967)
- (40) Levey, G.S., und I. Pastan:
Activation of thyroid adenylyl cyclase by long-acting
thyroid stimulator,
Life Sciences, Part I, 9, 67 (1970)
- (41) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall:
Protein Measurement with Folin Phenol Reagent,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- (42) Maisey, M.N. und L. Stimmler:
The Role of Long Acting Thyroid Stimulator in
Neonatal Thyrotoxicosis,
Clinical Endocrinology 1, 81 (1972)
- (43) Major, P.W., und D.S. Munro:
Thyroid stimulating activity in human sera,
J. Endor. 20, XIX (1960)
- (44) Manley, S.W., J.R. Bourke und R.H. Hawker:
The Thyrotrophin Receptor in Guinea-Pig Thyroid
Homogenate: General Properties,
J. Endocr. 61, 419 (1974)
- (45) McKenzie, J.M.:
The Bioassay of Thyrotropin in Serum,
Endocrinology 63, 372 (1958)
- (46) McKenzie, J.M.:
Neonatal Graves' Disease,
J. Clin. Endocr. 24, 660 (1964)
- (47) McKenzie, J.M., und J. Gordon:
The Origin of the Long-acting Thyroid Stimulator,
in: Cassano, C., und M. Andreoli (eds.):
"Current Topics in Thyroid Research",
Academic Press, New York 1965, S. 445

- (48) McKenzie, J.M., und A. Williamson:
Experience with the Bio-assay of the LATS,
J. Clin. Endocr. 26, 518 (1966)
- (49) McKenzie, J.M., und M. Zakarija:
A Reconsideration of a Thyroid-Stimulating Immuno-
globulin as the Cause of Hyperthyroidism in Graves'
Disease,
J. Clin. Endocr. 42, 778 (1976)
- (50) Mehdi, S.Q., S.S. Nussey, C.P. Gibbons und D.J. ElKabir:
Binding of Thyroid Stimulators to Human Thyroid
Membranes,
Biochem. Soc. Transactions 1, 1005 (1973)
- (51) Mehdi, S.Q., und S.S. Nussey:
A Radio-Ligand Receptor Assay for the Long-Acting
Thyroid Stimulator - Inhibition by the Long-
Acting Thyroid Stimulator of the Binding of
Radioiodinated Thyroid-Stimulating Hormone to
Human Thyroid Membranes,
Biochem. J. 145, 105 (1975)
- (52) Meinhold, H., und K.W. Wenzel:
Zur Methodik der direkten radioimmunologischen
Bestimmung von Trijodthyronin im Serum,
Z. clin.Chem.clin.Biochem. 12, 477 (1974)
- (53) Michie, W., J.S. Becker, R.G. Mahaffy, E.F. Honein
und G.B. Fowler:
Quantitative Radiological and Histological Studies
of the Thymus in Thyroid Disease,
Lancet 1, 691 (1967)
- (54) Miyai, K. M. Fukuchi, Y. Kumahara und H. Abe:
LATS Production by Lymphocyte Culture in Patients
with Graves' Disease,
J. Clin. Endocr. 27, 855 (1967)
- (55) Mukhtar, E.D., B.R. Smith, G.A. Pyle, R. Hall und P. Vice:
Relation of Thyroid-Stimulating Immunoglobulins to
Thyroid Function and Effects of Surgery, Radioiodine
and Antithyroid Drugs, Lancet 1/7909, 713 (1975)

- (56) Odell, L.D., J.F. Wilber und R.D. Utiger:
Studies of thyrotropin physiology by means of
radioimmunoassay,
Recent Progr. Hormone Res. 232, 47 (1967)
- (57) Onaya, T., M. Kotania, T. Yamada und Y. Ochi:
New in vitro tests to detect the thyroid stimulator
in sera from hyperthyroid patients by measuring
colloid droplet formation and cyclic AMP in human
Thyroid slices,
J. Clin. Endocr. 36, 859 (1973)
- (58) Orgiazzi, J. D.E. Williams, I.J. Chopra und D.H.Solomon:
Human Thyroid Adeny Cyclase-Stimulating Activity
in Immunoglobulin G of Patients with Graves' Disease,
J. Clin. Endocr. 42, 341 (1976)
- (59) Pinchera, A., M.G. Pinchera und J.B. Stanbury:
Thyrotropin and Long-Acting Thyroid Stimulator
Assays in Thyroid Disease,
J. Clin. Endocr. 25, 189 (1965)
- (60) Sakize, E., und R. Guillemin:
On a Method for Calculation and Analysis of Results
in the McKenzie Assay for Thyrotropin (TSH),
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 115, 856 (1964)
- (61) Schleusener, H., und K. Schimmelpfennig:
Die Bestimmung des "Long Acting Thyroid Stimulator"
nach säulenchromatographischer Serumfraktionierung,
in: Die Pathogenese des Diab. mellitus, Die endokrine
Regulation des Fettstoffwechsels, Schriftleitung
E. Klein, 12. Symp. d.Dt. Ges. f. Endokrinologie,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967,
S. 347
- (62) Schleusener, H., P. Kotulla, I. Kruck, G. Kruck,
D. Geißler und F. Adlkofer:
Comparison and evaluation of the radio-ligand
receptor assay and the mouse bioassay for the
detection of human thyroid stimulating immuno-
globulins,

in: Thyroid Research, Proceedings of the 7th International Thyroid Conference, Boston, Mass. 1975, eds. J. Robbins und L.E. Braverman, Excerpta Medica Amsterdam, 414 (1976)

- (63) Scott, T.W., B.F. Good und K.A. Ferguson:
Comparative Effects of Long-Acting Thyroid Stimulator and Pituitary Thyrotropin on the Intermediate Metabolism of Thyroid Tissue in vitro,
Endocrinology 79, 949 (1966)
- (64) Shishiba, Y., T. Shimizu, S. Yoshimura und K. Shizume:
Direct Evidence for Human Thyroidal Stimulation by LATS-Protector,
J. Clin. Endocr. 36, 517 (1973)
- (65) Silverstein, G.E., und G. Burke:
Thyroid suppressibility and long-acting thyroid stimulator in thyrotoxicosis,
Arch. Intern. Med. 126, 615 (1970)
- (66) Smith, B.R., D.S. Munro und K.J. Dorrington:
The Distribution of the Long-Acting Thyroid Stimulator Among γ G-Immunoglobulins,
Biochim.Biophys. Acta 188, 89 (1969)
- (67) Smith, B.R., und R. Hall:
Thyroid-Stimulating Immunoglobulins in Graves' Disease,
Lancet 2/7878, 427 (1974)
- (68) Sunshine, P., H. Kusumoto und J.P. Kriss:
Survival Time of Circulating Long-Acting Thyroid Stimulator in Neonatal Thyrotoxicosis: Implications for Diagnosis and Therapy of the Disorder,
Pediatrics 36, 869 (1965)
- (69) Verrier, B., G. Fayet und S. Lissitzky:
Thyrotropin-Binding Properties of Isolated Thyroid Cells and Their Purified Plasma Membranes - Relation of Thyrotropin-Specific Binding to Adenylate-Cyclase Activation,
Eur. J. Biochem. 42, 355 (1974)

- (70) Volpé, R., M. Edmonds, L. Lamki, P.V. Clarke und V.V. Row:
The Pathogenesis of Graves' Disease: A Disorder of Delayed Hypersensitivity ?
Mayo Clin. Proc. 47, 824 (1972)
- (71) Volpé, R., N.R. Farid, C. von Westarp und V.V. Row:
The Pathogenesis of Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis,
Clin. Endocrinology 3, 239 (1974)
- (72) Wall, J.R.; B.F. Good und B.S. Hetzel:
Long-acting thyroid stimulator in euthyroid relatives of thyrotoxic patients,
Lancet No. 7629, 1024 (1969)
- (73) Wall, J.R., B.F. Good, I.J. Forbes und B.S. Hetzel:
Demonstration of the production of the LATS by peripheral Lymphocytes cultured in vitro,
Clin. exp. Immunol. 14, 555 (1973)
- (74) Wenzel, K.W., H. Meinhold, M. Herpich, F. Adlkofer und H. Schleusener:
TRH-Stimulationstest mit alters- und geschlechtsabhängigem TSH-Anstieg bei Normalpersonen,
Klin. Wschr. 52, 722 (1974)
- (75) Werner, S.C., und S.R. Platman:
Remission of Hyperthyroidism (Graves' Disease) and Altered Pattern of Serum-Thyroxine Binding Induced by Prednisone,
Lancet 2, 751 (1965)
- (76) Werner, S.C., O. Wegelius, J.A. Fierer und K.C. Hsu:
Immunoglobulins (E,M,G) and Complement in the Connective Tissues of the Thyroid in Graves' Disease,
N. Engl. J. Med. 287, 421 (1972)

(77) Wong, E.T., und R.P. Doe:

Suppressibility of Thyroid Function Despite High
Levels of Long-Acting Thyroid Stimulator,
Ann. Intern. Med. 76, 77 (1972)

(78) Yamashita, K., und J.B. Field:

Effects of LATS on Thyrotropin Stimulation of
Adenyl Cyclase Activity in Thyroid Plasma Membranes,
J. Clin. Invest. 51, 463 (1972)

Herrn Prof. Dr. H. S c h l e u s e n e r
danke ich herzlich für die Überlassung des
Themas und für seine hilfreiche Unterstützung
bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. F r e y s c h m i d t
bin ich für die Übernahme des Korreferates
dankbar.

Danksagen möchte ich auch Herrn Dr. P. Kotulla
und Herrn Dr. S. Q. Mehdi für Anleitung und
Anregungen sowie Herrn Dr. H. Meinhold und
seinen Mitarbeitern für die Durchführung eines
Teiles der radioimmunologischen Tests.

Weiterhin bedanke ich mich im Labor bei allen,
die mir mit Rat und Tat halfen, und besonders
bei Irmtraut und Gerhard Kruck für die Zeit
freundschaftlicher Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Dürthen Geißler

Am 23. 11. 1942 wurde ich als Tochter von Alfred Geißler (jetzt Bundesbahn-Amtmann i. R.) und seiner Ehefrau Meta, geb. Eich, in Bad Homburg v.d.H. geboren.

Von 1949 bis 1953 besuchte ich eine Volksschule in Bad Homburg und von 1953 bis 1959 die Mittelschule Bad Homburg v.d.H., wo ich die Mittlere Reife erhielt.

Nach einer Lehre als Versicherungskaufmann in Frankfurt/Main (1959 - 1961) war ich als Schadenbearbeiterin von privaten Krankenversicherungen in Frankfurt/Main und Hamburg tätig (1961 - 1964).

1964 - 1965 erlangte ich das Wirtschaftsdolmetscherdiplom für Englisch und Französisch an einer Sprachenschule in Frankfurt und war 1966 bis 1968 als Auslandskorrespondentin bei Firmen in Bad Homburg v.d.H. und Berlin (West) beschäftigt. Das Abitur erwarb ich neben meiner beruflichen Tätigkeit durch den Besuch eines Berliner Abendgymnasiums (1966 - 1970). Im Winter 1968/69 begann ich mit dem Studium der Anglistik und Romanistik an der Freien Universität Berlin mit Kleiner Matrikel. Nach dem Abitur war mir ein Studienfachwechsel zur Medizin im Winter 1970/71 an der Freien Universität Berlin möglich, wo ich mein Studium am 26. 8. 1976 mit dem Staatsexamen beendete.

Ab Januar 1977 werde ich als Medizinalassistentin am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin tätig sein.

